

Histologische und autoradiographische Untersuchungen am menschlichen Endometrium unter der 2-Phasen-Therapie mit Mestranol—Lynestrenol

F. J. Kaltenbach, O. Fettig und J. Welter
Universitäts-Frauenklinik Freiburg i. Br.

Eingegangen am 8. Februar 1973

Histologic and Radioautographic Studies of the Human Endometrium under Sequential Oral Contraceptive Conditions

Summary. Alterations in the morphology of the endometrial layers and in the pattern of their DNA-synthesis were studied in 28 human females (25–48 years) who had received the sequential oral contraceptive Ovanon®, (7 days mestranol, followed by 15 days mestranol in combination with lynestrenol) 15 months each totalizing 305 cycles.

Morphological investigations of 97 biopsies of the endometrium yielded more appropriate changes of glands and stroma with the normophasic sequential treatment, compared with monophasic contraceptives. Tissue proliferated in the presence of estrogen component (0.08 mg mestranol). The subsequently applied combination of estrogens and gestagens (0.07 mg mestranol + 2.5 mg lynestrenol) effected pseudo-secretory changes. After prolonged use (from 7th cycle) serpentine of the tubular glands during the first half of the cycle gradually decreased.

During secretion phase the changes indicated abortive secretion with involution of tubular glands. The appearance was dominated from 8th to 18th day of cycle by a spotted stromal edema. At the end of the cycle venous ectasias appeared together with spiral arteries, displaying endothelial hyperplasia and proliferation. Moreover glandular and stromal atrophy could be observed, but did not increase with prolongation of treatment. It is suggested that such an endometrium is not apt for nidation of a fertilized ovulum. Proliferative activity of the Ovanon-treated endometrial tissue was studied by radioautography using ³H-thymidin. Based on silver grain counts in different layers of the endometrium, DNA-synthesis pattern was similar in the gland epithelium and in the superficial epithelium in the proliferative phase. No DNA-synthesis was found during the secretion phase.

Thymidin incorporation was observed during all cyclic phases in the stroma. It is concluded that permanent application of the hormone for 15 months does not result in significant changes of the endometrial DNA-synthesis pattern.

Zusammenfassung. Bei 28 Patientinnen zwischen 25 und 48 Jahren wurde der normophasische Ovulationshemmer Ovanon® (Mestranol und Mestranol in Kombination mit Lynestrenol), Sequenzfolge 7 + 15, hinsichtlich seiner morphologischen

Veränderungen am Endometrium und seiner Beeinflussung der DNS-Synthese in den Einzelabschnitten des Endometriums untersucht. Die Patientinnen wurden während 305 Cyclen über 15 Monate beobachtet.

Die morphologischen Untersuchungen des Endometriums anhand von 97 Endometriumbiopsien ergaben unter der normophasischen Sequenzbehandlung cyclusgerechtere Veränderungen von Stroma und Drüsen als bei der Kombinations-therapie. Unter dem 7tägigen Einfluß der Oestrogenkomponente (0,08 mg Mestranol) proliferierte das Gewebe. Die anschließend mit Oestrogenen verabreichten Gestagene (0,075 mg Mestranol und 2,5 mg Lynestrenol) bewirkten pseudo-sekretorische Veränderungen. Bei längerer Einnahmedauer (ab 7. Cyclus) sah man in der ersten Cyclushälfte trotz vorhandener epithelialer Proliferation zunehmend geringere Schlängelung der Drüsenschläuche. In der Sekretionsphase entsprechen die Veränderungen einer abortiven Sekretion mit involutierten Drüsenschläuchen. Zwischen dem 8. und 18. Cyclustag herrschte das Bild des fleckigen Stromaödems vor. Am Ende des Cyclus traten Venektasien und Spiralarterien mit Endothelhyperplasie und -proliferation auf. Außerdem wurde häufig eine Drüsen- und Stromaatrophy festgestellt, die jedoch bei zunehmender Behandlungsdauer keine Verstärkung aufwies. Für die Nidation eines befruchteten Eies scheint ein solches Endometrium nicht geeignet zu sein. Die Proliferationsaktivität des mit Ovanon behandelten Endometriums wurde durch die autoradiographische Methode mit ^3H -Thymidin untersucht. Aufgrund der Bestimmungen der ^3H -Indices der Einzelabschnitte des Endometriums fand sich ein ähnliches Verhalten der DNS-Synthese im Drüsenepithel und im Oberflächenepithel in der Proliferationsphase. In der Sekretionsphase war keine DNS-Synthese nachweisbar. Im Stroma dagegen ließ sich während aller Cyclusphasen Proliferations-tätigkeit finden.

Trotz der andauernden Hormonzufuhr im Laufe von 15 Behandlungsmonaten wurde keine statistisch signifikante Änderung der DNS-Synthese im Endometrium festgestellt.

Einleitung

In vorliegender Arbeit gingen wir der Frage nach, in wieweit die Einzelabschnitte und Proliferationsaktivität des menschlichen Endometriums von einem 2-Phasen-Ovulationshemmer (Mestranol-Lynestrenol¹) in verschiedenen Cyclusphasen und nach verschieden langer Einnahmedauer beeinflußt werden. Neben der lichtmikroskopischen Beurteilung der morphologischen Veränderungen am Endometrium untersuchten wir die DNS-Synthese mittels der autoradiographischen Untersuchungsmethode.

Der Nachweis der DNS-Synthese während des mensuellen Cyclus der Frau wurde von zahlreichen Autoren geführt. Hierzu wurden vorwiegend Mitosezählungen, aber auch Kernmessungen, histo-chemische Untersuchungen und photometrische Messungen der Feulgen-Reaktion durchgeführt (Ahrens u. Prinz, 1957; Wagner, 1968; Noyes *et al.*, 1950;

¹ Firmenbezeichnung: Ovanon®. Wir danken der Firma Organon, Oss/Holland, und der Firma Nourypharma, München, für die freundliche Überlassung der Versuchsmengen.

Sturgis, 1936; Bremer *et al.*, 1951; Vokaer *et al.*, 1953; Adinolfi-Ferrari, 1963; Schmidt-Matthiesen, 1963; Pinero u. Foraker, 1964).

Untersuchungen über die DNS-Synthese am Endometrium liegen bisher von Fettig und Oehlert (1964), Fettig (1965) und Norquist (1970) vor. Unter Verwendung der autoradiographischen Inkubationsmethode wurde von Fettig in den Drüsen und im Oberflächenepithel des menschlichen Endometriums während der Proliferationsphase ein hoher ^3H -Thymidin-Index, der während der Sekretionsphase absinkt, gefunden. Im Stroma fand sich in der Proliferationsphase ein ^3H -Thymidin-Indexpfel, der in der frühen Sekretionsphase abfiel und dann wieder zu einem zweiten Höhepunkt anstieg. Diese Untersuchungen wurden im wesentlichen von Norquist bestätigt.

Die Variabilität des DNS-Gehaltes im Endometrium im Laufe der einzelnen Cyclusbabschnitte hängt vom Blutspiegel der zugeführten Hormone ab, wie aus Beobachtungen am normalen mensuellen Cyclus und an Geweben von Menschen und Tieren hervorgeht. Auch McKern (1967), Segal und Scher (1967), Hamilton (1968) und Tata (1968) berichten über die Wirkung von Oestrogenen auf das Endometrium. Man fand, daß die Wirkung des Oestradiol mehr auf der nucleären Transkriptionsebene als auf der cytoplasmatischen genetischen Ebene stattfindet. Es kommt nach diesen Autoren zu einer Steigerung der DNS-, RNS- und Protein-Synthese bei Oestrogenzufuhr. Auch in Tierversuchen bei Ratten kam man zum gleichen Ergebnis (Brody und Westman, 1958; Boquoi, 1967; Norquist, 1970).

Progesteron soll nach Untersuchungen von O'Malley und McGuire (1968), Hahn *et al.* (1968) auch auf der nucleären Transkriptionsebene wirken. Norquist (1970) beschreibt Hemmeffekte des Progesterons auf die DNS- und RNS-Synthese in Gewebssuspensionen von normalem Endometrium, wobei die RNS-Synthese empfindlicher reagiert als die DNS-Synthese.

Material und Methode

Während 305 Cyclen bei 28 Patientinnen im Alter zwischen 25 und 48 Jahren wurde der normophasische Ovulationshemmer Mestranol-Lynestrenol zur Anti-konzeption angewandt.

Die Probandinnen, die ein oder mehrere Kinder geboren hatten, wurden in 6—8wöchigen Abständen zu einer Untersuchung einbestellt. Bei der gynäkologischen Untersuchung wurde jedesmal eine Endometriumbiopsie vorgenommen. Insgesamt kamen 97 Biopsien zur Auswertung.

Das Biopsiematerial wurde sofort in 5 ml Ringerlösung von 37°C gebracht, die Tritium-markiertes Thymidin mit einer Aktivitätskonzentration von 2 $\mu\text{C}/\text{ml}$ enthielt. Zur Verbesserung der Eindringtiefe der radioaktiven Substanz in das Biopsiegewebe wurde der jeweiligen Inkubationslösung Hyaluronidase (50 i.E./ml) hinzugegeben (Fettig und Oehlert, 1964). Die Inkubation erfolgte im Schüttelinkubator für 30 min bei konstanter Temperatur von 37°C. Nach erfolgter Inkubation wurde

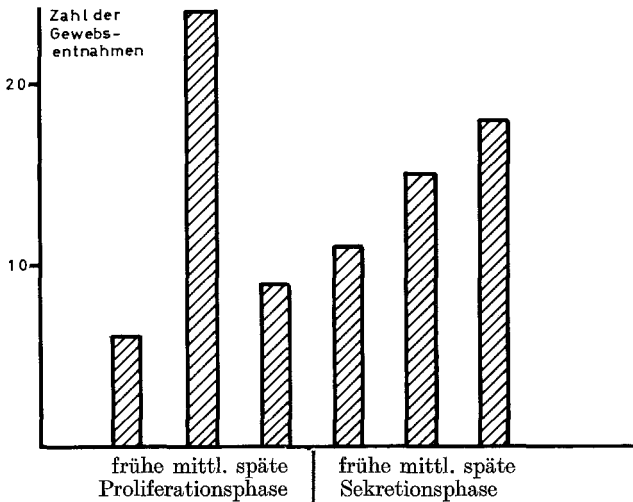


Abb. 1. Verteilung der Endometriumbiopsien über den Cyclus unter Ovanon®

das Gewebe in 5%igem neutral gepuffertem Formalin gewaschen und für 24 Std. in dieser Lösung fixiert. Danach folgte Einbettung der Gewebstücke in Paraffin und Aufarbeitung in Serienschnitte. Die Schnittstärke betrug $5\ \mu$. Als autoradiographische Technik wurde die von Bélanger und Leblond (1964) angegebene Methode mit flüssigen Emulsionen (Dipping-Methode) angewandt. Zur Herstellung der Autoradiogramme verwendeten wir die flüssige K 5-Emulsion (Ilford). Nach Beschriften der Präparate mit dieser Emulsion wurden diese 27 Tage bei 10°C in der Dunkelheit exponiert und anschließend entwickelt, fixiert und durch die Emulsion hindurch mit Hämatoxylin-Eosin und PAS-Reaktion gefärbt. Die Auszählung der Gewebstücke erfolgte nach der Zahl der ^3H -Thymidin-markierten Zellen. Pro Gewebe wurden 5mal 100 Zellen, insgesamt etwa 100000 Zellen ausgezählt. Als Maß für die Dichte der Markierung wurde der ^3H -Thymidin-Index herangezogen, der nach folgender Gleichung berechnet wurde:

$$^3\text{H-Index in \%} = \frac{\text{Zahl markierter Zellen} \times 100}{\text{Gesamtzellzahl.}}$$

Die autoradiographischen Diagramme standen gleichzeitig zur histologischen Auswertung zur Verfügung.

Morphologische Ergebnisse

Zur histologischen Auswertung kamen 97 Endometriumbiopsien. In 14 Fällen wurde Cervixschleimhaut und in 83 Fällen Endometrium gewonnen. Aus Abb. 1 geht die Verteilung der Gewebsentnahmen mit Endometrium über den ganzen Cyclus hervor. Die morphologische Klassifizierung der Endometriumsveränderungen während des Cyclus

Cyclusphase	5.-7.Tg.	8.-10.Tg.	11.-14.Tg.	15.-18.Tg.	19.-23.Tg.	24.-28.Tg.
frühe Proliferation	6	7	-	-	-	-
mittlere Proliferation	-	15	-	-	-	-
späte Proliferation	-	1	2	5	1	-
frühe Sekretion	-	1	2	1	1	-
mittlere Sekretion	-	-	-	-	2	1
späte Sekretion	-	-	-	-	-	5
abortive Sekretion	-	-	-	3	8	9
suppressed glands	-	-	-	-	1	3
mixed endometrium	-	-	5	2	2	1

Abb. 2. Morphologische Veränderungen am Endometrium während des Cyclus unter Ovanon®

wurde nach dem Grundschemata von Dallenbach-Hellwig (1969) und Schmidt-Matthiesen (1963) vorgenommen. In Anlehnung an Maqueo *et al.* (1963), wurde die morphologische Auswertung nach 4 Grundprinzipien durchgeführt. Es wurde auf Drüsenschlängelung, intraepitheliale Vacuolen, Sekretionszeichen, Stromaödem und pseudo-deciduale Reaktion des Stroma und auf Änderungen der Gefäße sowie Stroma- und Drüsenatrophie geachtet. Die morphologischen Veränderungen am Endometrium während des Cyclus unter Ovanon sind in Abb. 2 zusammengestellt. Zur näheren Beschreibung der spezifischen Veränderungen der Drüsen wurden die Begriffe abortive Sekretion (undatable secretion) und gehemmte Drüsen (suppressed glands) verwandt (Ober *et al.*, 1966).

In der frühen Proliferationsphase (5.—7. Cyclustag) fanden sich englumige, gestreckte Drüsenschläuche, die ein teils einreihiges, teils mehrreihiges Zylinderepithel aufwiesen. In 50% der Fälle waren die Drüsen in dichtes, spindelzelliges Stroma eingebettet. In den restlichen Fällen kamen nebeneinander zeldichtetes Stroma und Stromaödem vor (Abb. 3).

Mittlere Proliferationsphase (8.—10. Cyclustag)

Bei 24 Biopsien, die wir in dieser Zeit entnommen haben, entsprach in 15 Fällen das histologische Bild einer cyclusgerechten, mittleren

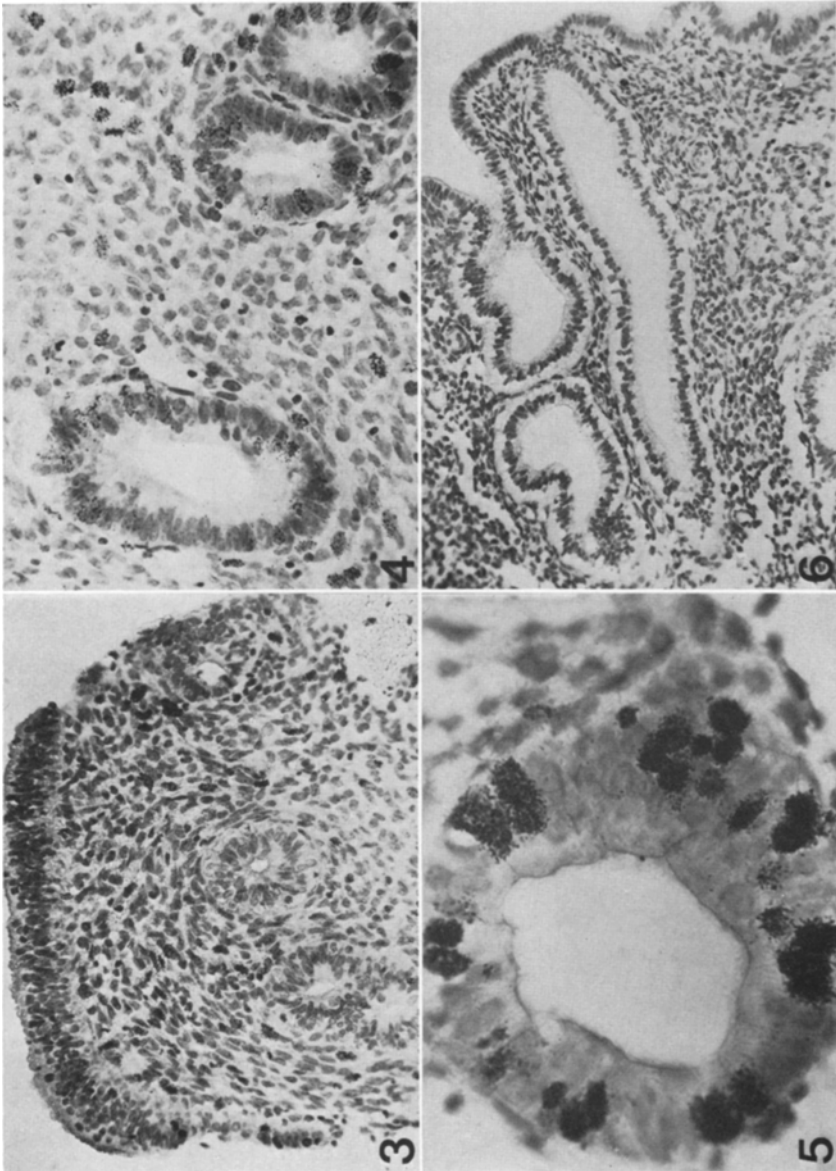


Abb. 3—6

Proliferation. In den anderen Fällen fanden sich auch Zeichen einer frühen und einer späten Proliferation sowie beginnender Sekretion mit retronucleären Vacuolen. Die Drüsenschläuche waren größtenteils eng

und gestreckt und ohne Sekretionszeichen. Überwiegend war das Stroma-ödem (18 Fälle) vorhanden. Teilweise fand sich auch ein fleckig-ödematöses Stroma.

In einem Drittel der Fälle wies das Stroma atrophische Veränderungen auf, wobei diese Atrophie nicht im Laufe der Cyclen zunahm (Abb. 4).

Späte Proliferationsphase (11.—14. Cyclustag).

In der Zeit vom 11.—14. Cyclustag zeigten 9 Biopsien überwiegend Proliferation und Sekretion nebeneinander (mixed endometrium). Es fanden sich aber auch späte Proliferation und beginnende Sekretion mit retronucleären Vacuolen. Proliferierende Drüsen waren noch gestreckt und wiesen nur einzelne Sekretvacuolen auf, während die Drüsen, die Sekretionszeichen aufwiesen, angedeutet geschlängelt waren und retronucleäre Vacuolen enthielten. Das Stromaödem nahm zu in dieser Phase, wobei das Nebeneinander von dichtem, ödematösem Gewebe im Sinne eines fleckigen Stromaödems auffiel (Abb. 5).

Frühe Sekretionsphase (15.—18. Cyclustag)

11 Endometriumbiopsien, die zwischen dem 15. und 18. Tag entnommen wurden, wiesen Zeichen für eine beginnende Sekretion auf, wie sie normalem Endometrium in der späten Proliferationsphase entsprechen. Teilweise fanden sich auch Endometriumbilder mit gestreckten, nicht sezernierenden Drüsen, die großenteils in dichtes Stroma eingebettet waren. Es fanden sich aber auch sezernierende Drüsen in fleckig-ödematösem Stroma. Auffallend waren abortiv sezernierende Drüsenschläuche mit kleinkalibrigen und ziemlich gestreckten Drüsen und nur wenig Cytoplasmavacuolen (Abb. 6).

Abb. 3. Endometrium. Frühe Proliferation, 5. Cyclus, 10. Tag. ^3H -Thymidin-Inkubation. Gestreckte Drüsen mit ein- bis mehrreihigem Epithel. DNS-Synthese in Stroma, Drüsen- und Oberflächenepithel. Nr. 446/71, $85\times$, K_5 -Emulsion

Abb. 4. Endometrium. Mittlere Proliferation, 5. Cyclus, 9. Tag. ^3H -Thymidin-Inkubation. Enges Drüsenlumen, ein- bis mehrreihiges Epithel. DNS-Synthese in Gefäßendothelien, Stroma und Drüsenepithel. Nr. 726/70, $130\times$, K_5 -Emulsion

Abb. 5. Endometrium. Späte Proliferation. 6. Cyclus, 12. Tag. ^3H -Thymidin-Inkubation. Ausgeprägte DNS-Synthese im Drüsenepithel. Nr. 197/71, $240\times$, K_5 -Emulsion

Abb. 6. Endometrium. Sekretionsphase. 4. Cyclus, 13. Tag. ^3H -Thymidin-Inkubation. Langgestreckte Drüsenschläuche ohne sägeblattförmige Schlängelung, beginnende Sekretion mit retronucleären Vacuolen. Nr. 826/70, $30\times$, K_5 -Emulsion

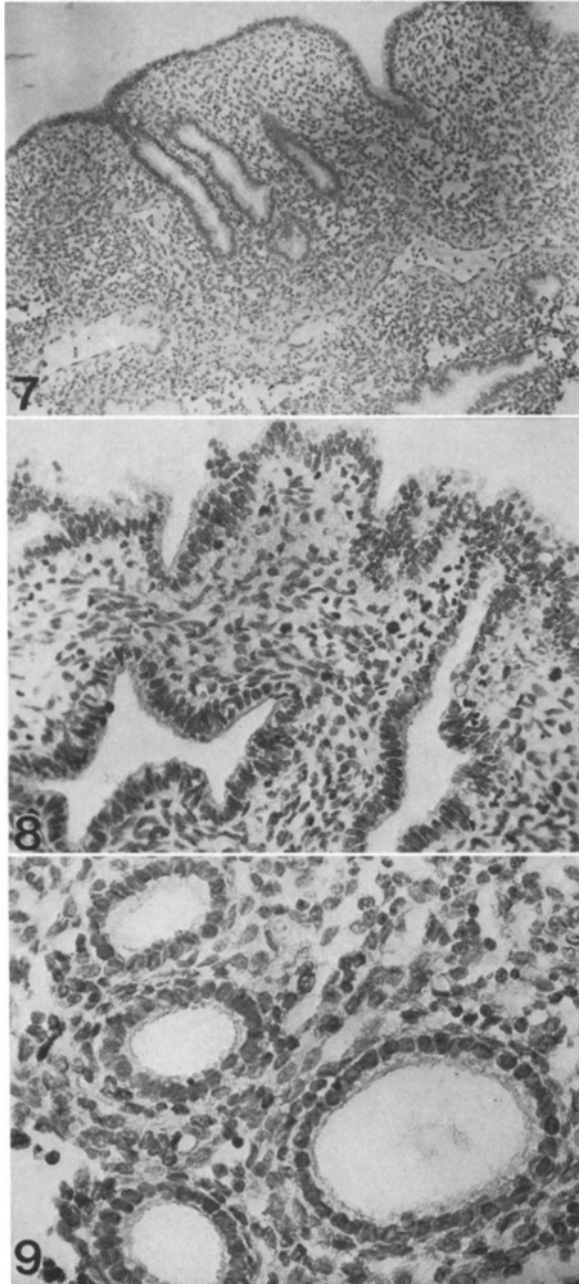


Abb. 7—9

Mittlere Sekretionsphase (19.—23. Cyclustag)

In dieser Phase wurden 15 Endometriumbiopsien durchgeführt. Vorherrschend war hierbei das Bild der abortiven Sekretion. Daneben fanden sich auch Befunde, die einer beginnenden, bzw. mittleren Sekretion entsprachen. Das Stroma zeigte sich in 40% atrophisch verändert. In etwa gleichem Maße traten Zelldichtigkeit und fleckiges Ödem des Stroma auf. Auffällig waren in 40% der Fälle Venektasien (Abb. 7).

Späte Sekretionsphase (24.—28. Cyclustag)

In diesem Cyclusabschnitt wurde in 18 Fällen Endometrium untersucht. Vorwiegend trat das Bild der abortiven Sekretion auf (Abb. 8). Aber es fanden sich auch sog. suppressed glands und Drüsenabschnitte, in denen proliferierende und auch unterdrückte Drüsen zusammen mit abortiv sezernierenden nebeneinander vorkamen. In einigen Fällen zeigten die Drüsen eine der normalen Cyclusphase entsprechende, sägeblattförmige Struktur mit voller Sekretion. Das Stroma zeigte dichtes oder aufgelockertes und fleckig-ödematöses Gewebe. In 2 Fällen konnte eine pseudodeciduale Stromaumwandlung festgestellt werden. Häufiger fanden sich Venektasien und Spiralarterien mit Endothelproliferation; andererseits aber auch Arterien mit hyalinisierten Gefäßwänden. In 50% der Fälle waren Stroma und Drüsen atrophisch verändert (Abb. 9).

Autoradiographische Ergebnisse

Für autoradiographische Untersuchungen standen uns 73 Endometriumbiopsien zur Verfügung. Davon waren 67 (etwa 90%) Autoradiogramme auswertbar. Insgesamt wurden zur Überprüfung der Proliferationsaktivität im Laufe des Cyclus und während der Einnahmezeit die Gewebentnahmen in den ersten 6 Monaten in der *Cyclusgruppe 1*, die der folgenden 9 Monate in der *Cyclusgruppe 2* zusammengefaßt.

In Anlehnung an Fettig (1964) wurden die Cyclusphasen in 4 *Tagesgruppen* eingeteilt (Abb. 10).

Abb. 7. Abortive Sekretion. 3. Cyclus, 25. Tag. ³H-Thymidin-Inkubation. Enge, gestreckte Drüsenschläuche mit einreihigem Zylinderepithel; weit ausgedehnte, venöse Gefäße. Nr. 540/70, 40 ×, K₅-Emulsion

Abb. 8. Abortive Sekretion. 7. Cyclus, 20. Tag. ³H-Thymidin-Inkubation. Angedeutet geschlängelte Drüsen mit teils kubischem, teils zylindrischem Epithel; fleckig-ödematöses Stroma. DNS-Synthese nur im Stroma. Nr. 828/70, 100 ×, K₅-Emulsion

Abb. 9. „Suppressed glands“. 5. Cyclus, 25. Tag. ³H-Thymidin-Inkubation. Einschichtiges, kubisches Epithel mit unterdrückter Sekretion in gestreckten Drüsenschläuchen; keine DNS-Synthese in Drüse und Stroma. Nr. 352/71, 145 ×, K₅-Emulsion

Cyclusgruppe / Tagesgruppe:

Tagesgruppe \ Cyclusgruppe	1	2	3	4
1	21.5	16.2	2.4	3.4
2	10.5	19.4	2.4	3.0

Cyclusgruppe / Endometrium:

Endometrium \ Cyclusgruppe	Stroma	Drüsenepithel	Oberflächenepithel
1	15.1	7.8	5.6
2	12.9	6.7	4.1

Endometrium / Tagesgruppe

Endometrium \ Tagesgruppe	1	2	3	4
Stroma	18.6	18.2	7.4	13.4
Drüsenepithel	19.4	20.0	0.8	1.0
Oberflächenepithel	9.7	15.1	1.0	0.5

Abb. 10. Erklärung siehe Text

Nach der Methode der kleinsten Quadrate wurden die folgenden Schätzwerte der ^3H -Indices (in %) ermittelt:

Cyclusgruppe I	(1.—6. Monat)	9,1
Cyclusgruppe II	(7.—15. Monat)	7,5
Tagesgruppe I	(1.—7. Tag)	15,5
Tagesgruppe II	(8.—14. Tag)	17,7
Tagesgruppe III	(15.—21. Tag)	2,4
Tagesgruppe IV	(22.—28. Tag)	3,2
Endometrium		14,0
Drüsenepithel		7,2
Oberflächenepithel		4,8

Die ^3H -Indices wurden für das Stroma, Drüsen- und Oberflächenepithel getrennt bestimmt. Nach der Methode der kleinsten Quadrate wurden die mittleren Schätzwerte für die Cyclusgruppen, die Tagesgruppen, die Endometriumsanteile und die dazugehörigen Wechselwirkungen berechnet (Abb. 10).

Das Endometrium zeigt von Beginn des Cyclus an eine deutliche Markierung mit ^3H -Thymidin in den Kernen des Drüsen-, Oberflächenepithels und des Stroma (Abb. 3—5, 10). Für die Drüsenzellen liegt in der 1. und 2. Hälfte der Proliferationsphase ein mittlerer ^3H -Index von etwa 20% mit Höchstwerten von 36,8% vor. Ab dem 10. Cyclustag als Folge der Gestagenzufuhr lassen sich als Zeichen beginnender Sekretion einzelne Zellen mit retronnucleären Sekretvacuolen nachweisen. Ab dem 13./14. Cyclustag ist die Sekretion deutlicher ausgeprägt und es kommt zu einem Stillstand der Proliferation der Drüsen (Abb. 6). In der folgenden Sekretionsphase wird bei unvollständiger sekretorischer Umwandlung die Zellneubildung beinahe ganz eingestellt. Man findet einen Rückgang der Indices von 20 auf 0,8% in der ersten und 1% in der zweiten Hälfte der Sekretionsphase (Abb. 7—9).

Das Oberflächenepithel zeigt ein ähnliches Verhalten wie das Drüsenepithel. Die Markierungsindices sind jedoch deutlich kleiner. In der Proliferationsphase steigt die Markierung gegen Cyclusmitte an (1.—7. Tag 9,7%, 8.—14. Tag 15%. Abb. 3). In der folgenden Sekretionsphase wird die DNS-Synthese im Oberflächenepithel wie Drüsenepithel nahezu eingestellt und der ^3H -Index fällt am 15.—21. Tag auf 1% und vom 22.—28. Tag auf 0,5% ab (Abb. 6—8).

Gegenüber Drüsen- und Oberflächenepithel findet man eine ^3H -Thymidinmarkierung der Zellkerne der Stromazellen in sämtlichen 4 Cyclusgruppen mit einem Indexgipfel in der Proliferationsphase (1.—7. Tag 18,6%, 8.—14. Tag 18,2%) (Abb. 3—5), einen Abfall in der frühen Sekretionsphase (7,4%, Abb. 6—9) und einen erneuten Anstieg gegen Ende des Cyclus (13,4%).

Unabhängig von der Cyclusphase wurden auch DNS-synthetisierende Zellen der Endometriumgefäße nachgewiesen. Insbesondere zeigen die Zellkerne der Gefäßendothelien ^3H -Thymidin-Markierung. Zur statistischen Sicherung der errechneten ^3H -Indices von Endometriumdrüse, Stroma und Oberflächenepithel führten wir eine Varianzanalyse durch. Nach den varianzanalytischen Berechnungen weisen die Cyclusgruppen 1 und 2 und die Wechselwirkungen Cyclusgruppe/Tagesgruppe und Cyclusgruppe/Endometrium keine signifikanten Unterschiede auf. Hochsignifikante Ergebnisse ließen sich für den allgemeinen Mittelwert \bar{u} , für die Tagesgruppen, für die Endometriumsgewebearten, Stroma, Drüsen- und Oberflächenepithel und für die Wechselwirkung Endometrium/Tagesgruppe errechnen. Lineare Vergleiche im Test nach Scheffé zeigten keine Signifikanz beim Vergleich des Drüsenepithels mit dem Oberflächenepithel und beim Vergleich der Tagesgruppen 1 mit 2 und 3 mit 4. Hohe Signifikanz ließ sich beim Vergleich von Stroma mit Drüsenepithel und Stroma mit Oberflächenepithel und beim Vergleich der Tagesgruppen 1 mit 3, 1 mit 4, 2 mit 3 und 2 mit 4 nachweisen.

Besprechung der Ergebnisse

Die morphologischen Veränderungen am Endometrium unter Kombinationspräparaten zeichnen sich durch Atrophie von Drüsen und Stroma aus. Hierdurch kommt es zur Ausbildung eines für die Nidation völlig insuffizienten Gewebes. Dieser Effekt fehlt bei der von Maqueo *et al.* (1964), Goldzieher *et al.* (1964), Ober (1966), Fettig *et al.* (1968) u. a. Autoren beschriebenen Sequenztherapie. Bei dieser Methode kommt es zu Veränderungen, die den normalen *Cyclus imitieren*. Es finden sich Sekretionszeichen um den 23.—24. Cyclustag bei einer Tablettensequenz 15 + 6. Diese Autoren fanden keine prädeciduellen Veränderungen und kein Auftreten von Spiralarterien. Ober (1966) konnte unter Zuführung von Gestagen über 10 Tage prädeciduale Veränderungen in 10% beobachten, während bei uns unter Anwendung von 15tägiger Gestagengabe nur ganz vereinzelt gegen Cyclusende diese Veränderungen vorkamen. Wir beobachteten unter dem bis zum 10. Tag allein wirkenden Oestrogeneinfluß unseres Präparates ein proliferierendes Endometrium mit englumigen Drüsenschläuchen ohne Zeichen von Sekretion. Die etwa ab dem 10. Tag zusammen mit Oestrogen verabreichten Gestagene bewirkten, daß in dem unvollständig proliferierenden Endometrium nach 1 oder 2 Tagen retronucleäre Sekretvacuolen auftraten. Es kam jedoch nicht zur Ausbildung eines der Norm entsprechenden Sekretionsbildes. Wir fanden dagegen großenteils das Bild der abortiven Sekretion (*undatable secretion*, Ober). Die Drüsen waren gestreckt, kleinkalibrig und nur angedeutet geschlängelt mit wenigen oder keinen Cytoplasmavacuolen, aber wiesen Spuren von PAS-positiven Substanzen auf. Vereinzelt waren die Drüsen in ihrer Entwicklung vor allem am Ende des *Cyclus* stark unterdrückt, so daß sie hyperinvolviert, kleinumig, mit kubischem, abgeflachtem Epithel ausgekleidet und in atrophisches Stroma eingebettet waren (*Suppressed glands*). Es fanden sich auch nebeneinander verschiedene Reifestadien, so daß eine zeitliche Einordnung des Gewebes kaum möglich war.

Das Stroma des Endometriums zeigt unter Kombinationspräparaten ab dem 10. Tag eine Auflockerung im Sinne eines Ödems. Um den 20. Cyclustag erreicht dieses Stromaödem seinen Höhepunkt. (Maqueo *et al.*, 1963; Ancla *et al.*, 1965; Friedrich, 1965). Bei den Sequenzpräparaten kommt es während der verlängerten Oestrogenphase zu einem angedeuteten Stromaödem und leicht geschlängelten Drüsen (Maqueo *et al.*, 1964; Fettig *et al.*, 1968; Blaustein *et al.*, 1968). Unter Ovanon war am Anfang der Proliferationsphase und in der 2. Hälfte der Sekretionsphase das Stroma überwiegend dicht. Vom 8.—18. Cyclustag hingegen fand sich eine ödematöse Auflockerung. Gegenüber den Befunden am unbehandelten *Cyclus* um den 8. und um den 22. Cyclustag, an dem man ein einheitliches Stromaödem findet (Schmidt-Matthiesen,

1963) erschien das Stroma des Endometriums unter unserem Präparat fleckig-ödematös, d. h. zeldichtes Stroma wechselte mit aufgelockertem, ödematösem ab.

Verschiedene Autoren beschrieben eine gleichbleibende Unterentwicklung der Spiralarterien (Ober, 1966; Ober *et al.*, 1966; Friedrich, 1965). Wir beobachteten unter Ovanon am Ende des Cyclus vereinzelt Spiralarterien, die wie unter Kombinationspräparaten Endothelhyperplasie mit Proliferation der Arterienwände und auch Hyalinisierung aufwiesen (Ancla *et al.*, 1965; Blaustein *et al.*, 1968). Es kann infolgedessen zu einer Änderung der Hämodynamik kommen. Diese Veränderungen der Spiralarterien können nach Ober (1966) und Waidl (1968) ein Faktor sein, der bei Durchbruchsovulation die Implantation verhindert, da ein erfolgreiches Aufrechterhalten einer Placentation durch fehlenden Kontakt zwischen den Spiralarterien und dem intervillösen Raum nicht stattfinden kann.

Sowohl das Stroma als auch die Drüsen zeigten andererseits unter Ovanon und anderen Sequenzpräparaten (Fettig, Kopecky, 1968) gegen Ende des Cyclus teilweise atrophische Erscheinungen wie Kleinzelligkeit und regressive Veränderung. Auch nach längerer Anwendungsdauer ist annähernd noch das gleiche Bild vorhanden ohne Verstärkung der Atrophie bei zunehmender Cyclenzahl wie bei Kombinationspräparaten, unter denen das Endometrium zunehmend atrophisch und regressiv verändert wird (Goldzieher *et al.*, 1964). Nach Fettig und Kopecky (1968) sind die Bilder des Endometriums am ehesten mit den Zeichen einer mittelschweren Ovarialinsuffizienz zu vergleichen im Sinne einer mangelhaften und unterschiedlichen Ansprechbarkeit des Gewebes auf die Hormone. Wir sind nicht der Meinung, daß die normophasische Sequenztherapie die Endometriumsveränderungen eines normalen Cyclus imitiert. Für eine Nidation scheint uns ein derartiges Endometrium nicht geeignet zu sein, so daß wir auch, wie unter anderen Sequenzpräparaten (Fettig u. Kopecky, 1968), in diesen Veränderungen einen nidationshemmenden Effekt sehen. Die Beeinflussung des Endometriums durch das von uns getestete Sequenzpräparat wird nicht nur durch morphologische Veränderungen, sondern auch durch die unterschiedliche DNS-Synthese gekennzeichnet.

Ausführliche Untersuchungen über die DNS-Synthese im unbehandelten Endometrium wurden mit der Autoradiographie (Fettig, 1965; Norquist, 1970), Mitosezählungen, Kernmessungen oder histo- bzw. cytochemische Untersuchungen durchgeführt.

In der Proliferationsphase konnten wir hohe DNS-Synthesetätigkeit in Drüsen- und Oberflächenepithel und einen starken Abfall infolge Sistierens der Zellneubildungen in der Sekretionsphase nachweisen. Das Stroma dagegen synthetisiert DNS während aller Cyclusphasen

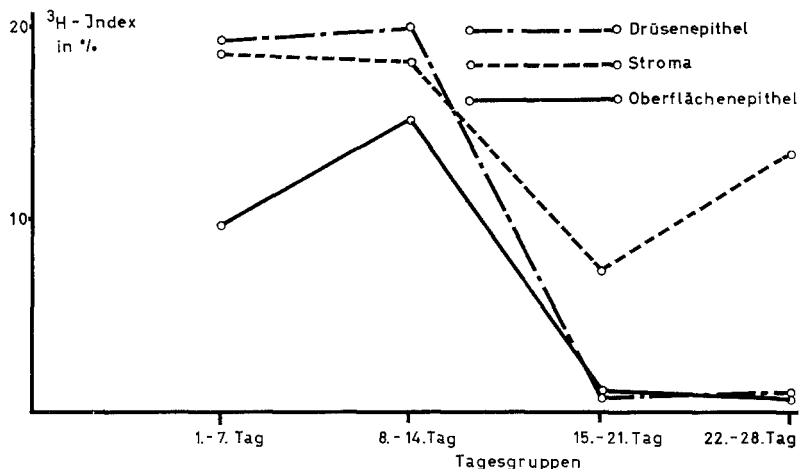


Abb. 11. Die ^3H -Indices des Endometriums unter Ovanon® im Laufe des Cyclus

mit einem ersten Höhepunkt in der Proliferationsphase und einem anschließenden Abfall in der frühen Sekretionsphase und einer erneuten ansteigenden DNS-Tätigkeit gegen Ende des Cyclus (Abb. 10 und 11). Dieses Ergebnis wird nach statistischer Auswertung der umfangreichen Zählungen bestätigt.

Es besteht zwischen Drüsen- und Oberflächenepithel kein signifikanter Unterschied, während beide im Vergleich mit dem Stroma hochsignifikant sind (Tabelle 1, 1.) Beim Vergleich der Tagesgruppen 1 und 2, die zur Proliferationsphase gehören und beim Vergleich der Tagesgruppen 3 und 4, die zur Sekretionsphase gerechnet werden, bestehen keine signifikanten Unterschiede. Dagegen unterscheiden sich die beiden Gruppen der Proliferationsphase hochsignifikant von denen der Sekretionsphase (Tabelle 1, 2).

Im Laufe der Behandlung, die wir bis zu 15 Monaten durchführten, veränderte sich die Proliferationsaktivität des Endometriums nicht, wie die varianzanalytischen Untersuchungen der Zählergebnisse der ^3H -Indices ergeben. Es finden sich keine signifikanten Unterschiede für die Cyclusgruppen 1 und 2 und für die Wechselwirkung Cyclusgruppe/Tagesgruppe und Cyclusgruppe/Endometrium (Abb. 10). Unsere morphologischen Beobachtungen, daß auch nach längerer Anwendungsdauer annähernd das gleiche Bild vorhanden ist, ohne daß sich die Atrophie des Endometriums wie unter Anwendung der Kombinationspräparate verstärkt, entspricht diesen Befunden.

Tabelle 1. Lineare Vergleiche im Test nach Scheffé

		Prüfquotient
1. Endometrium	Stroma gegen Drüsenepithel	22*
	Stroma gegen Oberflächenepithel	50*
	Drüsenepithel gegen Oberflächenepithel	6
2. Tagesgruppen:	Gruppe 1 gegen 2	1
	Gruppe 1 gegen 3	48*
	Gruppe 1 gegen 4	40*
	Gruppe 2 gegen 3	268*
	Gruppe 2 gegen 4	238*
	Gruppe 3 gegen 4	2

* = Irrtumswahrscheinlichkeit für den Fehler 1. Art $< 0,001$.

Da wir nach der Methode von Fettig in der Auswertung der autoradiographischen Präparate vorgehen, können wir die Werte für die DNS-Synthese im behandelten mit denen im unbehandelten Endometrium (Fettig, 1965) vergleichen (Abb. 12).

Beim Vergleich der ^3H -Indices vom normalen, unbehandelten Cyclus mit denen im behandelten Cyclus zeigt sich im Drüsen- und Oberflächenepithel eine verminderte oder gleich hohe Proliferation, während das Stroma in allen Cyclusabschnitten eine gesteigerte Proliferation unter normophasischer Sequenztherapie aufweist. Diese unter hormoneller Beeinflussung aufgetretenen Veränderungen sprechen dafür, daß die Gestagenkomponente eine synthesehemmende Wirkung hat und sich vor allem auf die Drüsen- und Oberflächenepithelien auswirkt, während die vermehrte DNS-Synthese im Stroma in allen Cyclusphasen wohl auf den Oestrogenanteil unseres normophasischen Ovulationshemmers zurückzuführen ist. Durch die Kombination mit Oestrogenen ist der Hemmeffekt des Progesterons weniger ausgeprägt (Brody und Westman, 1958). Nach Telfer und Hisaw (1957) kommt es sogar bei kombinierter Oestrogen-Gestagen-Therapie zu einem Anstieg der Nucleinsäuren. Die von uns beobachtete, gesteigerte Proliferation im Stroma stimmt auch mit den Untersuchungen Fettigs (1964) überein, der eine gesteigerte Proliferation im Stroma und eine geringe Drüsenmarkierung unter Oestrogen-Gestagen-Therapie (Primosiston®) feststellt.

Entgegen der Meinung anderer Autoren beschreibt Boquoi *et al.* (1968) eine Steigerung der DNS-Synthese unter Gestagen im Oberflächenepithel und im Stroma, was die von uns beobachtete Proliferationssteigerung im Stroma erklären könnte.

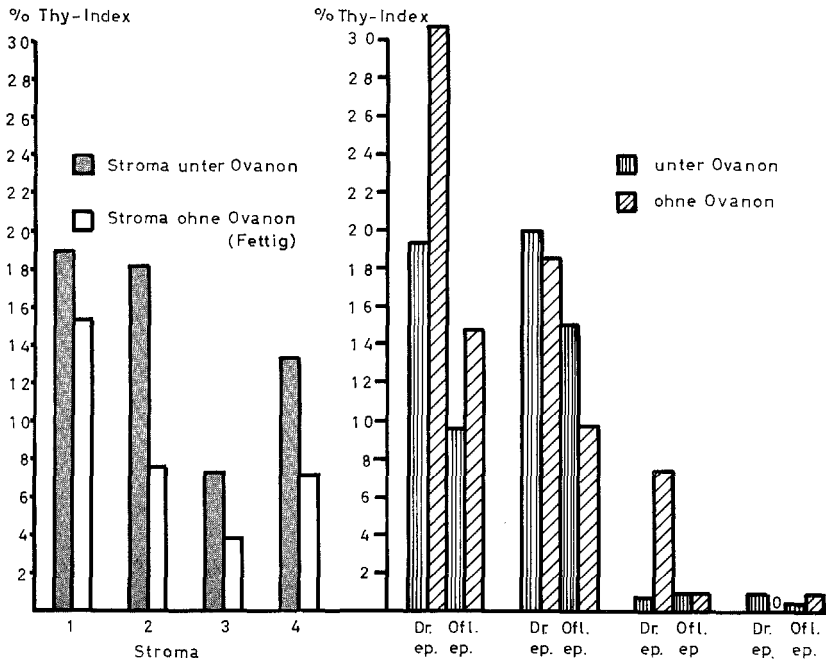


Abb. 12. Endometrium/Tagesgruppe: Vergleich des Endometrium unter Ovanon mit Endometrium ohne Ovanon im normalen Cyclus (nach Fettig 1964)

Literatur

- Adinolfi, G., Ferrari, V.: Zit. nach Schmidt-Matthiesen. Das normale menschliche Endometrium, S. 170. Stuttgart: Thieme 1963.
- Ahrnes, C.A., Prinz, G.: Mitosen im Endometrium. Geburtsh. u. Frauenheilk. **17**, 475—483 (1957).
- Ancla, M., Simon, P., Brux, J. de., Robey, M.: Endometriumveränderungen nach Langzeitbehandlung mit Lynestrenol. Gynec. et Obstét. **64**, 231—250 (1965).
- Bélanger, L.F., Leblond, C.P.: A method for location radioactive elements in tissues by covering histological sections with a photographic emulsion. Endocrinology **39**, 8—13 (1946).
- Blaustein, A., Shenker, L., Post, R.C.: The effects of oral contraceptives on the endometrium. Int. J. Teril. **13**, 466—475 (1968).
- Boquoi, E., Beato, M., Ebner, H., Sandritter, W.: DNS-Gehalt und ³H-Thymidineinbau des Endometriums der weißen Maus während des normalen Cyclus nach Kastration und unter Östrogen-Gestagen-Behandlung. Arch. Gynäk. **206**, 181—194 (1968).
- Boquoi, E., Müller, J.E.: Ein Beitrag zur Frage der Wirkung von sog. Ovulationshemmern auf das Epithel von Cervix uteri und Vagina. Zbl. Gynäk. **89**, 1318—1323 (1967).
- Bremer, E., Ober, K.G., Zander, J.: Histochem. Untersuchungen über das Verhalten der Nucleinsäuren im Endometrium. Arch. Gynäk. **181**, 96—108 (1951).

- Brody, S., Westman, A.: Effects of oestradiol and progesterone on the acids and protein content of the rabbit uterus. *Acta Endocr.* **27**, 493 (1958).
- Dallenbach-Hellwig, G.: *Endometrium*. Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1969.
- Fettig, O.: Autoradiograph. Untersuchungen zur DNS-, RNS- und Proteinsynthese am Portioepithel und Endometrium der Frau. Habilitationsarbeit 1964.
- Fettig, O.: Autoradiograph. Untersuchungen der DNS-, RNS- und Proteinsynthese im menschl. Endometrium in Abhängigkeit von der Ovulation. *Arch. Gynäk.* **202**, 246—248 (1965).
- Fettig, O.: ^3H -Index-Bestimmungen und Berechnungen der mittleren Generationszeit (Lebensdauer) der Einzelabschnitte nach autoradiograph. Untersuchungen mit ^3H -Thymidin des gesunden und krankhaften Endometriums. *Arch. Gynäk.* **200**, 659—677 (1965).
- Fettig, O., Hillemanns, H. G., Kopecky, P.: Erfahrungen mit der Sequenztherapie. *Geburtsh. u. Frauenheilk.* **28**, 975—976 (1968).
- Fettig, O., Kopecky, P.: Klinische und morphologische Untersuchungen zur hormonellen Antikonception mit der Sequentialmethode. *Geburtsh. u. Frauenheilk.* **28**, 540—553 (1968).
- Fettig, O., Oehlert, W.: Autoradiograph. Untersuchungen der DNS- und Eiweißneubildung im gynäkolog. Untersuchungsmaterial. *Arch. Gynäk.* **199**, 649—662 (1964).
- Friedrich, E. R.: Effects of contraceptive hormone preparations on the fine structure of the endometrium. *Obstet. and Gynec.* **30**, 201 (1967).
- Goldzieher, J. W., Becerra, C., Gual, C., Livingstone, N. B., Maqueo, M., Moses, L. L. E., Tietze, Ch.: New oral contraceptive sequential estrogen and progestin. *Amer. J. Obstet. Gynec.* **90**, 404—441 (1964).
- Hahn, W. E., Church, R. B., Gorbman, A., Wilmot, L.: Estrone- and progesterone-induced synthesis of new RNA species in the chick oviduct. *Gen. comp. Endocr.* **10**, 438—442 (1968).
- Hamilton, R. H.: Control by estrogen of genetic transcription. *Science* **161**, 649—661 (1968).
- Maqueo, M., Becerra, C., Mungia, H., Goldzieher, J. W.: Endometrial histology and vaginal cytology during oral contraception with sequential estrogen and progestin. *Amer. J. Obstet. Gynec.* **98**, 395—400 (1964).
- Maqueo, M., Perez-Vega, E., Goldzieher, J. W., Martinez-Manautou, J., Rudel, H.: Comparison of the endometrial activity of 3-synthetic progestins used in fertility control. *Amer. J. Obstet. Gynec.* **85**, 427—432 (1963).
- McKern, K. W.: Genetic, biochemical and hormonal mechanism in the regulation of uterine metabolism. In: *Cellular biology of the uterus*, p. 71—113, ed. R. Wynn. Amsterdam: North Holland 1967.
- Norquist, S.: The synthesis of DNA and RNA in normal human endometrium in short-term incubation in vitro and its response to oestradiol and progesterone. *J. Endocr.* **48**, 17—28 (1970).
- Noyes, R. W., Hertig, A. T., Rock, J.: Dating the endometrial biopsy. *Fertil. and Steril.* **1**, 3 (1950).
- Ober, W. B.: Synthetic progestagen-oestrogen preparations and endometrial morphology. *J. clin. Path.* **19**, 138—147 (1966).
- Ober, W. B., Decker, A., Clyman, M. J., Roland, M.: Endometrial morphology after sequential medication with mestranol and chlormadinone. *Obstet. and Gynec.* **28**, 247—253 (1966).

- Oehlert, W., Lesch, R., Dörmer, P.: Autoradiograph. Untersuchungen des DNS-, RNS-Stoffwechsels am menschlichen Excisionsmaterial. *Naturwissenschaften* **23**, 713—714 (1963).
- O'Malley, B. W., McGuire, W. L.: Studies on the mechanism of action of progesterone in regulation of the synthesis of specific protein. *J. clin. Invest.* **47**, 654—664 (1968).
- Pinero, O., Foraker, A. G.: DNA and RNA in normal human endometrium. *Amer. J. Obstet. Gynec.* **89**, 657—660 (1964).
- Schmidt-Matthiesen, H.: *Das normale menschliche Endometrium*. Stuttgart: Thieme 1963.
- Segal, S. J., Scher, W.: Estrogens, nucleic acids and protein synthesis in uterine metabolism. In: *Cellular biology of the uterus*, p. 114—150, ed. R. M. Wynn. Amsterdam: North Holland 1967.
- Song, J., Mark, M., Lawler, M. P.: Endometrial changes in women receiving oral contraceptives. *Amer. J. Obstet. Gynec.* **107**, 717—728 (1970).
- Sturgis, S. H., Meigs, J. V.: Endometrial cycle and mechanism of normal menstruation. *Amer. J. Surg.* **33**, 369 (1936).
- Tata, J. R.: Hormonal regulation of growth and protein synthesis. *Nature (Lond.)* **219**, 331—337 (1968).
- Vokaer, R., Gompel, C., Ghilain, A.: Variations in the content of DNA in the humane uterine and in vaginal receptors during the menstrual cycle. *Nature (Lond.)* **172**, 31—32 (1953).
- Wagner, D., Richart, R., Terner, J. Y.: DNA-content of human endometrial gland cells during the menstrual cycle. *Amer. J. Obstet. Gynec.* **100**, 90—97 (1968).
- Waidl, E., Fikentscher, H., Brückner, W.: Die intercellulären Strukturen des Endometriums bei der oralen Kontrazeption. *Geburtsh. u. Frauenheilk.* **28**, 159 (1968).

Prof. Dr. O. Fettig
Geburtsh.-Gynäk.-Klinik
d. St.-Vincentius-Krankenhäuser
D-7500 Karlsruhe 1
Südenstraße 32
Bundesrepublik Deutschland

Dr. F. J. Kaltenbach
Dr. J. Welter
Universitäts-Frauenklinik
D-7800 Freiburg i. Br.
Hugstetterstraße 55
Bundesrepublik Deutschland